



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Patentschrift
10 DE 37 14 276 C 2

21 Aktenzeichen: P 37 14 276.3-44
22 Anmeldetag: 29. 4. 1987
43 Offenlegungstag: 17. 11. 1988
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 19. 9. 2002

5 Int. Cl.⁷:
C 08 F 218/08
C 08 F 216/06
C 08 F 8/12
C 08 F 2/16
B 01 D 15/08
C 07 K 17/08
C 12 N 11/08
A 61 K 47/00
C 08 F 216/00

DE 37 14 276 C 2

// C08F 216/06(C08F 218/08,216:38,226:02, 226:06,216:12,218:08, 224:00)C08F 2/18, 2/20,C07K 7/40,A61K 39/44,39/385,37/32, C12N 9/04,9/76,9/92, 9/08,9/48

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:
Celanese Ventures GmbH, 60311 Frankfurt, DE

72 Erfinder:
Mauz, Otto, Dr., 65835 Liederbach, DE; Nun, Edwin,
Dipl.-Chem., 35085 Ebsdorfergrund, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

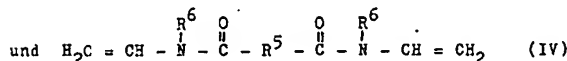
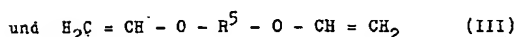
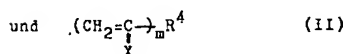
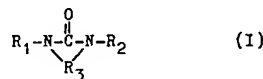
DE 33 44 912
DE 32 09 224
DE 23 37 828
DD 1 01 168
US 37 61 357
US 30 55 866

"Hochmolekularbericht", 1969, Ref. H. 2735/69
der BE 696252;

"Hochmolekularbericht", 1983, Ref. H. 9676/83
der SU 887579;

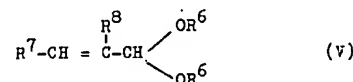
54 Hydrophile, vernetzte Polymerisate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

57 Hydrophiles, vernetztes Polymerisat in Form von porösen, perlförmigen Teilchen, bestehend aus
A) Einheiten a) wasserlöslicher copolymerisierbarer Monomerer und/oder b) Vinylacrylat- und/oder Vinylalkohol-Einheiten,
B) 1 bis 80 Gew.-%, bezogen auf das Polymere, an Einheiten eines vernetzenden Monomeren,
C) Einheiten von acetalgruppenhaltigen copolymerisierbaren Monomeren und
D) gegebenenfalls Einheiten weiterer copolymerisierbarer Monomerer,
dadurch gekennzeichnet, daß sich die vernetzenden Einheiten B) von mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formeln



ableiten, wobei R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und Vinyl-, 1-Acyloxy-Vinyl, Allyl- oder 2-Acyloxy-Allyl bedeuten und die Acyloxy-Gruppen 2 bis 18 C-Atome enthalten, R³ einen zweiwertigen, gesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 2 bis 8 C-Atomen darstellt, R⁴ für einen zwei-, drei- oder vierwertigen, gesättigten Kohlenwasserstoff-

rest mit 1 bis 8 C-Atomen steht, m der Wertigkeit dieses Restes entspricht und X Acyloxy mit 2 bis 18 C-Atomen bedeutet, R⁵ für -(CH₂)₁₋₂₀-, -(CH₂CH₂O)₁₋₁₉-CH₂CH₂- oder -(CH₂CH₂CH₂CH₂O)₁₋₁₉-CH₂CH₂CH₂-CH₂- und R⁶ für Alkyl mit 1-4 C-Atome stehen, daß sich die Einheiten der Komponente C) von mindestens einer Verbindung der Formel V



herleiten, wobei R⁷ und R⁸ gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff oder unverzweigtes Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen stehen, R⁶ die vorstehend genannte Bedeutung hat oder die beiden Reste R⁶ zusammen auch R³, wie vorstehend definiert, sind und vorzugsweise einen Rest mit 2 bis 3 C-Atomen bedeuten;

daß die Komponente A) mindestens eine Verbindung aus der Gruppe Vinylether der Formel CH₂=CH-OR⁹, in der R⁹ Methyl oder den Rest-(CH₂-CH₂-O)_nH, wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, darstellt, N-Vinylactam, N-Vinylalkylamid mit 1 bis 3 C-Atomen im Alkylrest oder Vinylacrylat mit 2 bis 18, vorzugsweise 2 bis 6 C-Atomen im Acrylatrest ist

und daß die Einsatzmengen der Monomerkomponenten folgende Werte haben:

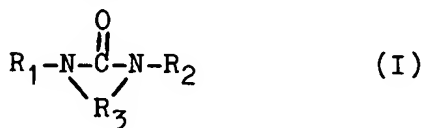
A) 10 bis 90,
C) 0,5 bis 60, und
D) 0 bis 20 Gew.-%, wobei Summe der Komponenten A) bis D) stets 100% ist.

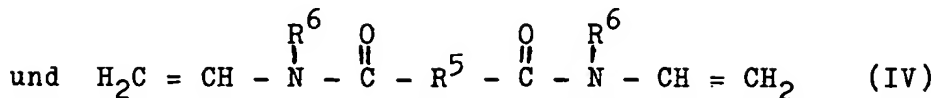
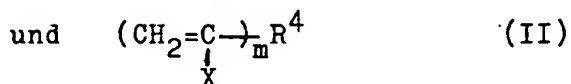
DE 37 14 276 C 2

- [0001] Die Erfindung bezieht sich auf hydrophile, vernetzte Polymerisate mit porösen, perlförmigen Teilchen, die aus Einheiten wasserlöslicher Monomere oder Vinylacrylat- und/oder Vinylalkoholeinheiten, vernetzender Monomere, acetalgruppenhaltiger Monomere und gegebenenfalls weiterer Monomere bestehen. Diese Polymerisate können biologisch aktive Substanzen binden.
- [0002] Es ist bekannt, biologisch aktive Substanzen, wie Enzyme, Antikörper, Antigene, Hormone und dergleichen unter Erhalt ihrer Aktivität an polymere Trägermaterialien über kovalente Bindungen zu fixieren, um auf diesem Weg beispielsweise Enzyme zu stabilisieren, zu reinigen oder wasserunlöslich zu machen. Solchermaßen immobilisierten biologisch aktiven Substanzen bieten erhebliche Vorteile gegenüber der löslichen Form: zum einen ist die Abtrennbarkeit durch Sedimentation nach Beendigung einer Reaktion vereinfacht, zum anderen ist die Stabilität und Wiederverwendbarkeit der Präparate um ein Vielfaches erhöht.
- [0003] Hydrophile, vernetzte Trägercopolymerisate, welche Carbonylgruppen oder Acetalgruppen enthalten, sind bekannt. Es ist auch bekannt, zur Vernetzung von Polymeren Divinyläthylenharnstoff einzusetzen (DE-OS 33 44 912).
- [0004] Polymerisate dieser Art sind aber ohne eine zusätzliche vorherige Aktivierung nicht geeignet, um biologisch aktive Substanzen, beispielsweise Enzyme, dauerhaft und zuverlässig zu immobilisieren.
- [0005] Ein Verfahren zur Herstellung aldehydgruppenhaltiger polymerer Träger für die Fixierung biologisch aktiver Substanzen ist ebenfalls bekannt (DD-PS 101 168). Bei der Herstellung dieser Träger werden vorzugsweise Acrolein, Acrylamid und Divinyl- und Diacrylverbindungen wie Glykoldimethylacrylat, insbesondere aber Methylenbisacrylamid als Vernetzungsmittel eingesetzt.
- [0006] Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß perl- und granulatförmige Polymerisate bei einer Fällungspolymerisation kaum entstehen. Es resultieren dagegen pulverförmige Produkte, welche zur Füllung von Säulen ungeeignet sind.
- [0007] Es sind ferner polymere Mikrokügelchen mit einer Größe im Bereich von etwa 0,03 bis 80 µ bekannt (DE-OS 32 24 484), die durch Polymerisation einer Verbindung des Acrolein-Typs hergestellt werden, und die mit N,N'-Methylen-bis-(acrylamid) vernetzt sein können und zur Bindung von z. B. Enzymen dienen. Diese Mikrokügelchen haben den Nachteil, daß biologisch aktive Substanzen nur an der Oberfläche fixiert werden und daß der Vernetzer nicht hydrolysestabil ist.
- [0008] Ebenso werden Mikrokügelchen mit einem Durchmesser von 0,05–10 µ beschrieben (US-PS 4.413.070), die aus 20 bis 90 Gew.-% Acrolein oder Acroleinderivaten, 10–50 Gew.-% eines wasserlöslichen Acryl-Monomeren, das eine Amino-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppe enthält, und 0,1–20 Gew.-% Vernetzungsmittel hergestellt werden und zur Bindung von z. B. Äthylenglykoldimethacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat, N,N'-Methylen-bis-(acrylamid), Hexahydro-1,3,5-triacryloyl-s-triazin oder Divinylbenzol eingesetzt. Auch diese Polymerisate haben den Nachteil, daß die biologisch aktiven Substanzen nur an der Oberfläche fixiert werden und die Vernetzer z. T. nicht hydrolysestabil sind.
- [0009] Ein hydrophiles, wasserunlösliches, aber in Wasser quellbares Polymerisat mit Aldehydgruppen in den Seitenketten, die mindestens zum Teil mit einem Enzym zur Reaktion gebracht wurden, ist ebenfalls bekannt (US-PS 3.761.357). Die Hydrophilie dieser Polymeren wird durch weitere Seitengruppen, aliphatische Dimethylacetalgruppen und Amidgruppen bewirkt. Durch die große Quellbarkeit eignet sich das Copolymer aber nicht als Säulenfüllmaterial.
- [0010] Es sind auch Carbonylcopolymere beschrieben worden (DE-OS 25 37 828), die mit einem Dialdehyd z. B. Glutaraldehyd mit Hilfe einer Aldol-Kondensation vernetzt worden sind und Enzyme binden. Diese Vernetzung ist aber auch wenig hydrolysebeständig.
- [0011] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Nachteile der vorgenannten Trägercopolymerisate zu vermeiden und für den sauren und alkalischen Bereich hydrolysenbeständige Trägerpolymerisate bereitzustellen, die es erlauben, biologisch aktive Substanzen in einem weiteren pH-Bereich einzusetzen, ohne daß ihre Aktivität verloren geht.
- [0012] Die Erfindung betrifft ein hydrophiles, vernetztes Polymerisat mit porösen, perlförmigen Teilchen, bestehend aus

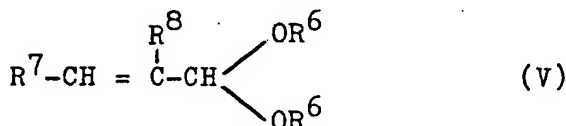
- A) Einheiten a) wasserlöslicher copolymerisierbarer Monomere und/oder b) Vinylacetat- und/oder Vinylalkohol-Einheiten,
- B) 1 bis 80 Gew.-%, bezogen auf das Polymere, an Einheiten eines vernetzenden Monomeren,
- C) Einheiten von acetalgruppenhaltigen copolymerisierbaren Monomeren und
- D) gegebenenfalls Einheiten weiterer copolymerisierbarer Monomere,

bei dem sich die vernetzenden Einheiten B) von mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formeln





ableiten, wobei R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und Vinyl-, 1-Acyloxy-Vinyl, Allyl- oder 2-Acyloxy-Allyl bedeuten und die Acyloxy-Gruppen 2 bis 18 C-Atome enthalten, R^3 einen zweiwertigen, gesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 2 bis 8 C-Atomen darstellt, R^4 für einen zwei-, drei- oder vierwertigen, gesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 8 C-Atomen steht, in der Wertigkeit dieses Restes entspricht und X Acyloxy mit 2 bis 18 C-Atomen bedeutet, R^5 für $-(\text{CH}_2)_{1-20}$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-19}$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-19}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ und R^6 für Alkyl mit 1-4 C-Atome stehen und daß sich die Einheiten der Komponente C) von mindestens einer Verbindung der Formel V



herleiten, wobei R^7 und R^8 gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff oder unverzweigtes Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen stehen, R^6 die vorstehend genannte Bedeutung hat oder die beiden Reste R^6 zusammen auch R^3 , wie vorstehend definiert, sind und vorzugsweise einen Rest mit 2 bis 3 C-Atomen bedeuten.

[0013] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von vernetzten Polymerisaten wie vorstehend beschrieben durch Copolymerisation von A) a) wasserlöslichen Monomeren und/oder b) Vinylacrylatverbindungen, B) vernetzenden Monomeren, C) Acetalgruppen enthaltenden copolymerisierbaren Monomeren und D) gegebenenfalls weiteren copolymerisierbaren Monomeren, bei dem die erhaltenen Copolymerisate nach der Polymerisationsreaktion isoliert oder bei Anwesenheit von Vinylacrylateinheiten auch anschließend zumindest teilweise versifit werden.

[0014] Vorzugsweise sind die Acrylatgruppen der Vinylacrylat-Einheiten vollständig durch OH-Gruppen ersetzt.

[0015] Schließlich bezieht sich die Erfindung auch auf die Verwendung der erfindungsgemäßen Polymerisate als Adsorbens in der Chromatographie oder als Trägermaterial für biologisch aktive Substanzen.

[0016] Die Komponente A) umfaßt a) wasserlösliche copolymerisierbare Monomere wie Vinyläther der Formel $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{OR}^9$, in der R^9 Methyl oder den Rest $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$, wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, darstellt. Bevorzugte Vinylverbindungen sind N-Vinylactame und N-Vinylalkylamide mit 1-3 C-Atomen im Alkylrest wie N-Vinylpyrrolidon und N-Vinyl-N-methylacetamid. Besonders bevorzugt ist der Einsatz von b) Vinylacrylatverbindungen, deren Acrylatreste nach erfolgter Copolymerisation teilweise oder vollständig hydrolysiert werden. Die Vinylacrylat-Einheiten des erfindungsgemäßen Polymerisates enthalten 2 bis 18, vorzugsweise 2 bis 6 C-Atome im Acrylatrest. Bevorzugt ist dies der Acetat- oder Propionatrest. Es können auch verschiedene Acrylatreste im Polymerisat vorhanden sein, d. h. zu seiner Herstellung können auch Gemische der entsprechenden Vinylacrylate eingesetzt werden. Ebenfalls können Gemische der Komponenten a) und b) verwendet werden. Die eingesetzten Verbindungen der Komponente A) bewirken eine Hydrophilie der erfindungsgemäßen Copolymerisate. Ihre Einsatzmengen betragen 10 bis 90, vorzugsweise 20 bis 80 und insbesondere 30 bis 70 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der Monomeren A) bis D).

[0017] Vernetzungsmittel der Komponente B) sind Verbindungen der Formel (I), in der R^3 bevorzugt einen gesättigten, verzweigten oder unverzweigten aliphatischen Kohlenwasserstoffrest mit 2 bis 5, insbesondere 2 bis 4 C-Atomen darstellt. Bevorzugt ist dies der Äthylen- oder Propylenrest. Falls R^1 und R^2 für 1-Acyloxy-Vinyl- oder 2-Acyloxy-Allyl stehen, so enthält die Acyloxy-Gruppe darin vorzugsweise 2 bis 6 C-Atome, und zwar den Acetat- oder Propionatrest. Vorzugsweise aber haben die Reste R^1 und R^2 die Bedeutung von Vinyl. Eine besonders bevorzugte Vernetzer-Einheit in dem erfindungsgemäßen Polymerisat leitet sich dementsprechend von N,N'-Divinyläthylenharnstoff ab. Dieser Vernetzer bewirkt eine besonders hydrolysebeständige Verknüpfung. Ein weiterer bevorzugter Vertreter ist N,N'-Divinylpropylenharnstoff.

[0018] Die Herstellung derartiger Verbindungen ist bekannt und beispielsweise beschrieben in der US-Patentschrift 2.541.152 oder in Ullmann, Enzyklopädie der technischen Chemie, Bd. 23, 611 (4. Auflage).

[0019] In dem Vernetzungsmittel gemäß der Formel (II) hat R^4 bevorzugt die Bedeutung eines verzweigten oder unverzweigten Alkylrestes mit 2 bis 6, vorzugsweise 2 bis 4 C-Atomen. Die Acyloxy-Gruppe hat hier vorzugsweise die gleiche Bedeutung wie oben bei der Formel (I) beschrieben. Ein bevorzugter Vernetzer dieser Art ist beispielsweise 3,3-Dimethylpentadien-2,4-diacetat, das besonders leicht mit dem Vinylacrylat copolymerisiert. Die Herstellung derartiger Verbindungen kann beispielsweise durch Umsatz des entsprechenden Di-, Tri- oder Tetraketons mit Vinylacrylat oder Isoprenylacrylat in Gegenwart saurer Katalysatoren unter Bildung der entsprechenden Enolacrylate erfolgen. Das gleichzeitig entstehende Aceton muß dabei laufend durch Destillation aus dem Gleichgewicht entfernt werden. Ein weiteres Vernetzungsmittel ist 3,3,4,4-Tetramethylhexadien-2,5-diacetat.

[0020] Die Herstellung der Vernetzungsmittel der Formel (III) ist bekannt und beschrieben in den US-Patentschriften 3.813.348, 4.547.298 und 4.394.403.

[0021] Vernetzungsmittel der Formeln (III) und (IV) sind Alkyl- und Polyalkylenglykoldivinyläther wie Di- und Tri-

äthylenglykoldivinyläther, ferner N,N'-Divinyl-N,N'-dialkyl-carbonsäureamide, bevorzugt sind Butandioldivinyläther, Äthylenglykoldivinyläther und N,N'-Divinyl-N,N'-dimethyl-adipinsäureamid.

[0022] Die erfindungsgemäßen Copolymerisate enthalten im allgemeinen 1–80 Gew.-%, bevorzugt 2–50 Gew.-% und insbesondere 15–30 Gew.-% Vernetzungsmittel B), bezogen auf die Gesamtmenge der Komponenten A) bis D).

- 5 [0023] Acetalgruppen enthaltende copolymerisierbare Monomere (Komponente C), die biologisch aktive Substanzen kovalent binden, sind z. B. 2-Methylvinyl-dioxan-1,3, vorzugsweise 2-Vinyl-dioxan-1,3, insbesondere 2-Vinyl-dioxolan-1,3 sowie 2-Methylcrotonaldehyddiäthylacetal, vorzugsweise Crotonaldehyddiäthylacetal, insbesondere Acroleindi-methylacetal und -diäthylacetal.

- 10 [0024] Sie sind im Copolymeren in Mengen von 0,5–60 Gew.-%, vorzugsweise 2–10 Gew.-% enthalten, bezogen auf die Gesamtmenge der Komponenten A) bis D).

[0025] Gegebenenfalls können noch weitere copolymerisierbare Monomeren D) bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Copolymerisate in untergeordneten Mengen bis zu 20 Gew.-% eingesetzt werden. Insbesondere kann man z. B. durch Verwendung bestimmter, hydrophob wirkender Monomere die Hydrophilie der Polymerisate beliebig einstellen, was übrigens auch im Falle der Anwesenheit von Acylatgruppen in Polymeren über eine partielle Hydrolyse möglich ist.

- 15 Geeignete hydrophobe Monomere sind z. B. Propenyl- und Isopropenylacetal.

- [0026] Das erfindungsgemäß vernetzte Polymerisat liegt vorzugsweise im Form von Perlen vor, die überwiegend kugelförmige Gestalt aufweisen, deren mittlere Teilchengröße im trockenen, ungequollenen Zustand 5 bis 700 µm, vorzugsweise 20 bis 500 µm und insbesondere 25 bis 400 µm beträgt und die vorzugsweise eine enge Teilchengrößenverteilung aufweisen. Das jeweilige Optimum der Teilchengröße hängt dabei vor allem von dem speziellen Einsatzgebiet ab. Bei einem ohne Druck durchgeführten Säulenverfahren wird man beispielsweise die Teilchengröße innerhalb der vorstehend genannten Grenzen entsprechend größer wählen als bei einem Druck-Verfahren. Die Perlen des erfindungsgemäßen Polymerisates sind überwiegend makroporös ausgebildet. Der mittlere Porendurchmesser liegt im allgemeinen im Bereich von 2 bis 1000 nm, vorzugsweise 5 bis 500 nm und insbesondere 20 bis 200 nm.

- 20 [0027] Die Bestimmung des Porendurchmessers (Porenvolumens) kann in der Weise erfolgen, daß zunächst das Porenvolumen gemäß der Kapillardruckmethode (Quecksilberporosimetrie) bestimmt wird (vgl. hierzu "Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie", Bd. 5 (1980), S. 751–752). Daraus ergibt sich dann der mittlere Porendurchmesser durch Berechnung nach der auf Seite 752, linke Spalte oben, dieser Literaturstellen angegebenen Gleichung. Daneben ist eine Porengrößenbestimmung auch durch Rasterelektronenmikroskopie möglich.

- [0028] Die Polymerisate haben ein Ausschlußmolekulargewicht von 10^3 bis 10^8 , bevorzugt von 5×10^4 bis 10^7 , besonders bevorzugt von 5×10^5 bis 5×10^6 .

- 30 [0029] Die Herstellung des erfindungsgemäßen vernetzten Polymerisates erfolgt in bekannter Weise, vorzugsweise unter den Bedingungen der Suspensionspolymerisation, in Gegenwart eines Dispersionsmittels, eines Dispersionsstabilisators und gegebenenfalls weiterer Zusatzstoffe sowie gegebenenfalls eines radikalisch wirksamen Initiators und vorzugsweise eines inerten Verdünnungsmittels.

- 35 [0030] Um eine möglichst hohe Porosität der Polymerisate zu erreichen, werden dem Polymerisationssystem oder vorzugsweise den Monomeren bestimmte inerte, flüssige Komponenten zugesetzt (Verdünnungsmittel). Hierunter sollen solche Stoffe verstanden sein, in denen sich die Monomeren gut lösen oder mit ihnen mischbar sind, andererseits aber im Dispersionsmittel praktisch unlöslich und damit mit diesem nicht mischbar sind. Derartige Verdünnungsmittel und ihre Wirkungsweise sind beispielsweise beschrieben in der DE-Patentschrift 1.517.935 sowie in Makromol. Chemie 176, S. 657 ff. (1975).

[0031] Das optimale Verdünnungsmittel bzw. Verdünnungsmittelgemisch läßt sich durch einige einfache Routineversuche leicht ermitteln. Die Porengröße ist durch Art und Zusammensetzung sowie der Menge der Inertkomponente beeinflusbar, hängt aber auch von der Menge an vernetzender Komponente ab.

- 40 [0032] Die Verdünnungsmittel können allein oder in Mischung eingesetzt werden und Lösungs- oder Fällungsmittel für Polyvinylacetat sein. Als Beispiele seien genannt: C₅ bis C₁₀-Alkanole wie Butanol, Cyclohexanol, Isooctanol, vorzugsweise 2-Äthylhexanol, Ester wie Butylacetat, Butylglykolacetat, Glycerintriacetat, Amide wie Dimethylformamid, Dimethylacetamid, Pyrrolidon, Ketone wie Aceton, Cyclohexanon, Diisopropylketon, Äther z. B. Dialkyläther mit mindestens 6 C-Atomen wie Di-n-butyläther und Di-n-amyläther, Diphenyläther, cyclische Äther mit bis zu 9 C-Atomen, Arylalkyläther mit 1 bis 4 C-Atomen im Alkylrest wie Anisol, Kohlenwasserstoffe wie Hexan, Isooctan, Paraffinöl, Cycloalkane mit 6 bis 12 C-Atomen wie Cyclohexan, Cyclooctan, einkernige aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzol, Toluol und die verschiedenen Xylole sowie N-substituierte Lactame wie N-Methylpyrrolidon-2, N-Methylcaprolactam und N-Methylpiperidon-2. Bevorzugt werden als Verdünnungsmittel Dialkyläther mit mindestens 6 C-Atomen wie Di-n-butyläther oder Di-n-amyläther oder Mischungen, die Di-n-butyläther und 2-Äthylhexanol enthalten, eingesetzt.

- 55 [0033] Die Menge an zugesetztem Verdünnungsmittel ist weitgehend variabel. Sie hängt u. a. von der Monomerzusammensetzung, insbesondere des Gehaltes an Vernetzer, der erwünschten Porosität (Porengröße) sowie vom genauen Verwendungszweck des Polymeren ab. So wird sich bei einem hohen Vernetzungsgrad eine entsprechend große Menge an Verdünnungsmittel empfehlen, um eine bestimmte Porosität (Porengröße) zu erreichen. Bei ein und demselben Vernetzungsgrad wird die Porosität gleichfalls umso größer sein, je mehr an Verdünnungsmittel eingesetzt wird. Naturgemäß läßt sich dies nur innerhalb bestimmter Grenzen steigern, da sonst die mechanische Festigkeit zu gering wird. In den meisten Fällen wird ein Volumen an Verdünnungsmittel, das dem 0,02- bis 5-fachen, vorzugsweise dem 0,04- bis 3-fachen Volumen an eingesetzten Monomeren entspricht, zufriedenstellende Ergebnisse liefern.

- 60 [0034] Als radikalisch wirksame Initiatoren kommen erfindungsgemäß solche in Betracht, die in der Monomerphase gut löslich sind. Beispiele hierfür sind organische Peroxide, wie Di-tert.-butylperoxid, Dibenzoylperoxid, Cumolhydroperoxid, Cyclohexanonperoxid oder aliphatische Azoverbindungen, wie α,α' -Azodiisobuttersäurenitril, Azo-bis-cyanvaleriansäure, 1,1'-Azo-cyclo-hexan-1,1'-dicarbonsäuredinitril und Azodicarbonamid. Gegebenenfalls können auch entsprechende Redoxsysteme Verwendung finden. Die Menge an Initiator beträgt zumeist 0,01–5 Gew.-%, vorzugsweise 0,1 bis 2 Gew.-% (bezogen auf die Gesamtmenge der Monomeren). Möglich ist auch die Initiierung der Polymerisation durch Strahlung oder Ultraschall, gegebenenfalls bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Initiators.

- [0035] Als Dispersionsmittel zur Durchführung der Perlpolymerisation dienen vor allem solche Verbindungen, die unter Normalbedingungen flüssig sind, einen Siedepunkt von oberhalb 60°C, vorzugsweise im Bereich von 85–300°C, aufweisen und welche die Monomeren, das Polymere und vorzugsweise auch den Initiator unter den Polymerisationsbedingungen nicht oder jedenfalls nur spurenweise lösen, um eine Emulsionspolymerisation zu unterbinden. Das Verhältnis der Monomerphase zur Dispersionsmittelpase kann in weiten Grenzen variieren, beispielsweise zwischen 2 : 1 bis 1 : 50, vorzugsweise 1 : 1 bis 1 : 15 (Gewichtsverhältnis). Bevorzugt wird erfindungsgemäß als Dispersionsmittel Wasser oder eine neutrale oder alkalische, wäßrige Pufferlösung eingesetzt. Vorteilhafterweise ist dies eine Pufferlösung, die im alkalischen Bereich arbeitet und durch Hydrolyse von Vinylacrylat gebildete Säuren abfängt. Dieser Puffer besteht vorzugsweise aus $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ beziehungsweise aus NaHCO_3 . 5
- [0036] Es ist von Vorteil, dem Polymerisationsansatz ein hydrophiles Schutzkolloid zuzusetzen, um ein Zusammenkleben der Monomertröpfchen zu verhindern. 10
- [0037] Solche sogenannten Dispersionsstabilisatoren, die ein Agglomerieren der Perlen während der Polymerisation verhindern sollen, sind die hierfür bekannten Verbindungen. Vorzugsweise ist dies ein hydrophiles Polymer wie Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, Polyacrylamid, Acrylamid-N-Alkylacrylamid-Copolymere, Polyäthylenglykol, Methylcellulose oder Äthylenoxid-Propylenoxid-Copolymere. Polyvinylpyrrolidon wird für diesen Zweck besonders bevorzugt. Diese Dispersionsstabilisatoren sind bereits in Mengen von 0,001 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge an Monomeren, wirksam. Zumeist werden Mengen von 0,005 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 0,01–20 Gew.-% (bezogen auf die Gesamtmenge an Monomeren) verwendet. 15
- [0038] Der Zusatz eines Elektrolyten (im Falle von Wasser als Dispersionsmittel), beispielsweise eines Salzes wie Kochsalz zur wäßrigen Phase ist im allgemeinen vorteilhaft, da er die fast vollständige Verdrängung der Monomeren aus der äußeren Phase, dadurch eine fast völlige Unterdrückung von Emulsionsbildung und daneben eine Steigerung der Perlausbeute bewirkt. Der Elektrolytzusatz kann darüber hinaus teilweise auch die Wirkung eines Schutzkolloids haben. Zumeist wird dieser Elektrolyt in Mengen bis zu 50 Gew.-%, vorzugsweise bis zu 30 Gew.-%, bezogen auf das Dispersionsmittel, verwendet. 20
- [0039] Bei Vorliegen von Acrylat-Gruppen im erfindungsgemäßen Polymerisat sind diese vorzugsweise zu OH-Gruppen verseift, wobei der Verseifungsgrad zumindest 10%, im allgemeinen mehr als 50%, vorzugsweise mehr als 70% und insbesondere 90 bis 100% beträgt. Für manche Zwecke der Gelchromatographie kann es von Vorteil sein, zumindest einen Teil der OH-Gruppen mit hydrophobierenden Gruppen, die keine reaktiven Reste mehr enthalten, zu belegen. 25
- [0040] Die erfindungsgemäßen Polymerisate zeichnen sich insbesondere durch eine hohe Hydrolysenbeständigkeit bei hoher Vernetzungsdichte aus. Diese hohe Hydrolysenbeständigkeit ist nicht nur in der Gelchromatographie, sondern auch bei Einsatz als Trägermaterial für biologisch aktive Substanzen wie Enzyme von großer Bedeutung. Auf Träger fixierte Enzyme werden häufig über Jahre im stark alkalischen oder stark sauren Milieu eingesetzt. Dies trifft im besonderen Maße für die "unspezifischen Hydrolasen" zu, die Ester- oder Carbonsäureamid-Bindungen spalten. Im übrigen ist die stabile Vernetzung auch bei der Verseifung der Acrylat-Gruppen zu OH-Gruppen in den erfindungsgemäßen Polymerisaten vorteilhaft. 30
- [0041] Das erfindungsgemäße Verfahren wird zweckmäßigerweise in einem mit einer Rührvorrichtung versehenen Reaktionsgefäß bei Temperaturen von zumeist 20–150°C, vorzugsweise 40–100°C, insbesondere 60–90°C und einem Druck von 1–10 bar, vorzugsweise 1–5 bar, durchgeführt. Die Teilchengröße des Perlpolymerisates wird in bekannter Weise durch die Rührgeschwindigkeit und das Phasenverhältnis eingestellt. Günstig auf den Verlauf der Polymerisation ist auch eine stufenweise Erhöhung der Temperatur. 35
- [0042] Nach Beendigung der Polymerisationsreaktion werden die nicht umgesetzten Monomeren aus dem Reaktionsgefäß entfernt, z. B. durch Verdampfen bei vermindertem Druck, vorzugsweise bei einem Druck von 0,1–15 mbar. Nach der Entfernung der Restmonomeren wird das Dispersionsmittel vom festen Polymeren abgetrennt, z. B. durch Dekantieren, Filtrieren oder Absaugen des Überstandes. Das eingesetzte Verdünnungsmittel kann zuvor durch Wasserdampfdestillation entfernt werden. Anschließend wird das Polymerisat, falls erforderlich, mit leichtsiedenden organischen Lösungsmitteln, z. B. einem Kohlenwasserstoff, einem niederen Alkohol oder Aceton gewaschen und schließlich getrocknet. Die Trocknung des Polymerisates erfolgt bei einer Temperatur von zumeist 20–100°C, vorzugsweise von 20–80°C; eine Trocknung unter vermindertem Druck ist dabei empfehlenswert. 40
- [0043] Enthält das so erhaltene Polymerisat Acrylatgruppen, so ist dieses Polyvinylacrylatgel nicht hydrophil; zur Anwendung in Wasser muß die Estergruppe hydrolysiert werden. Das kann in bekannter Weise alkalisch durch Quellen des Produktes in einem Alkohol wie z. B. Methanol und Zugabe von wäßrigem Alkali wie z. B. Natronlauge geschehen oder durch Umesterung des alkoholgequollenen Produkts mit katalytischen Mengen Säure oder Base bei laufender z. B. destillativer Entfernung des gebildeten Esters (vgl. DE-Patentschrift 15 17 935). Die Verseifung kann auf jeder beliebigen Stufe abgebrochen werden, so daß je nach Verwendungszweck der Grad der Hydrophilie des Gels eingestellt werden kann. 45
- [0044] Die erhaltenen Trägerpolymerisate eignen sich für die Immobilisierung von biologisch aktiven Substanzen durch Ausbildung einer kovalenten Bindung, z. B. einer Azomethinbindung. Durch Hydrierung dieser Azomethingruppe mit z. B. Natriumborhydrid werden äußerst hydrolysestabile Bindungen erzielt. 50
- [0045] Unter dem Begriff "biologisch aktive Substanzen" werden die bekannten in vivo oder in vitro wirksamen natürlichen oder künstlich hergestellten Stoffe verstanden, wie Enzyme, Aktivatoren, Inhibitoren, Antigene, Antikörper, Vitamine, Hormone, Effektoren, Antibiotika, Proteine und dergleichen. Der letztere Begriff umfaßt dabei auch Proteine mit bestimmten Nicht-Proteinsubstituenten wie Metallionen, Polysacchariden, Porphyringruppen, Adenindinucleotid, Ribonucleinsäure, Phospholipide etc. Auch Polypeptidfragmente, z. B. die aktiven Teile von Enzymmolekülen, fallen unter den Begriff "biologisch aktive Substanzen". 55
- [0046] Von den vorstehend genannten biologisch aktiven Substanzen sind die Enzyme bevorzugt. Beispiele für Enzyme sind Urease, Penicillinacylase, D-Aminosäureoxidase, Adenyldesaminase, Alkohol-Dehydrogenase, Asparaginase, Carboxypeptidase, Chymotrypsin, Diphosphoesterase, -Glucosidase, Glucose-Isomerase, Glucose-Oxidase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Invertase, -Lactamase, Lactase, Lactat-Dehydrogenase, versch. Lectine, 60

NAD-Kinase, Neuraminidase, Papain, Peroxidase, Phosphatasen (alkalisch und sauer), 5'-Phosphodiesterase, Pyruvat Kinase, Ribonuclease, Trypsin.

[0047] Beispiele für andere biologisch aktive Substanzen sind Hormone, wie Insulin und die verschiedensten Hypophysen-Hormone, Proteine der gamma-Globulinfraction, z. B. Antikörper der Klasse G, M, A, D und E, andere Blutfaktoren, z. B. Antihämophiliefaktor, die Blutgerinnungsfaktoren, spezielle Antikörper, z. B. Hepatitis-, Poliomyelitis-, Finnen-, Mumps-, Influenza- oder Kaninchenantikörper, Antigene, wie Hepatitis-, Polyomyelitis-, Finnen-, Mumps-, Influenza- oder Kaninchenantigene zur Reinigung oder Stimulierung geeigneter Antikörperreaktionen, wobei das Antigen (nach dem Unlöslichmachen) in der unlöslichen Form verbleibt und folglich nicht in den Körper eindringen und diesen schädigen kann, sowie allgemeine Körperproteine, wie Hämoglobin und Albumin.

[0048] Die erfindungsgemäßen Polymerisate eignen sich u. a. als stationäre Phase in der Gelchromatographie und als Trägermaterial für biologisch aktive Substanzen.

[0049] Die Bindung der biologisch aktiven Substanzen an die Trägercopolymerisate ist an sich bekannt und erfolgt allgemein so, daß zunächst der Träger durch Abspaltung der Acetalgruppen aktiviert, das heißt in die freie Aldehydgruppe überführt wird. Dazu werden z. B. 50 mg Trägermaterial 15 Minuten lang mit 1 ml 1 n HCL behandelt und anschließend mit Wasser neutral gewaschen. Der nutschenfeuchte Träger wird dann mit einer biologisch aktiven Substanzlösung versetzt, fixiert und die spezifische Aktivität bestimmt.

[0050] In den nachfolgenden Beispielen bedeuten T stets Gewichtsteile und % stets Gewichtsprozent.

Beispiele

1) 65 T Vinylacetat, 5 T Acroleindimethylacetal, 20 T Divinyläthylenharnstoff und 1 T α, α' -Azodiisobuttersäurenitril (AIBN) wurden gemischt und 160 T einer Mischung von 97% Di-n-butyläther und 3% 2-Äthylhexanol zugefügt, wobei Divinyläthylenharnstoff vollständig gelöst wurde. Diese Mischung wurde unter Rühren in 500 ml Wasser von 60°C gegeben, das 1% Polyvinylpyrrolidon enthält. Nach Durchlaufen eines bestimmten Temperaturprogramms (1 Stunde bei 60°C halten, 1 Stunde bei 70°C und 1 Stunde bei 80°C halten, danach auf 90°C erhöhen) war die Polymerisation nach 8 Stunden beendet.

2) Beispiel 1 wurde wiederholt mit folgender Monomermischung: 65 T Vinylacetat, 5 T Acroleindimethylacetal, 30 T Divinyläthylenharnstoff und 0,5 mol.-% AIBN als Initiator.

3) Beispiel 1 wurde wiederholt unter Verwendung der Monomermischung: 60 T Vinylacetat, 10 T Acroleindimethylacetal, 30 T Divinyläthylenharnstoff und 0,5 mol.-% AIBN.

4) 50 mg eines nach Beispiel 1 hergestellten Trägers wurden wie vorstehend beschrieben mit 1 n Salzsäure aktiviert (Spaltung der Acetalgruppen). Anschließend wurden 1000 μ l einer Ureaselösung mit einem Gehalt von 30 mg/ml (das sind 65 Units pro ml), die 1 molar an Kaliumphosphatpuffer war und einem pH-Wert von 8,0 aufwies, zugegeben. Nach einer Fixierungsdauer von 16 Stunden unter Schüttelbewegung bei 23°C wurden die erhaltenen Perlen mit 1 molarer Kochsalzlösung und mit Wasser gründlich gewaschen. Die Ausbeute an nutschenfeuchtem Material betrug 242 mg. Die spezifische Aktivität wurde am Autotitrator bei 30°C auf Harnstoff als Substrat, das mit 0,1 molarer Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,1 eingestellt worden war, bestimmt.

5 + 6) Analog Beispiel 4 wurden die in folgender Tabelle aufgeführten Trägermaterialien aktiviert, fixiert und die spez. Aktivität gemessen.

Enzym: Urease 30 mg/ml

Einwaage: 50 mg Träger; Substrat: Harnstoff

Bei- spiel	μ l Enzym- lsg.	Units	Quell- faktor	Feucht- ausbeute (mg)	spez. Aktivität U/g feucht	spez. Aktivität U/g trocken	Fixierungs- bzw. Bindungs- ausbeute (%)
2	1000	60	3,6	182	114	416	35
3	1000	60	3,2	158	98	312	26

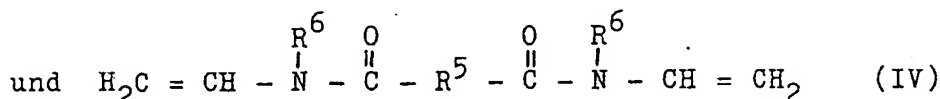
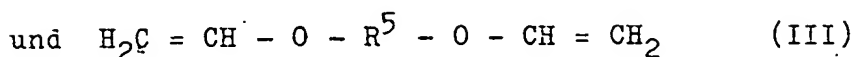
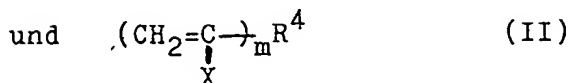
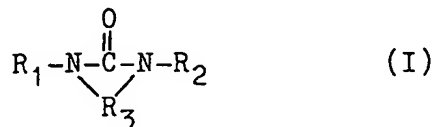
[0051] Als spezifische Aktivität wird die Umwandlung von 1 μ mol Substanz pro Minute mal Gramm angesehen. Die Bindungsausbeute gibt das Verhältnis von trägergebundener Aktivität zu der angebotenen Aktivität an.

[0052] Die erhaltenen erfindungsgemäßen Trägermaterialien sind permanent makroporös, druckstabil und resistent gegen Mikrobenbefall.

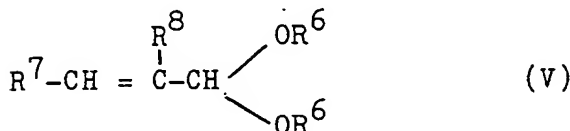
Patentansprüche

- Hydrophiles, vernetztes Polymerisat in Form von porösen, perlförmigen Teilchen, bestehend aus
 - Einheiten a) wasserlöslicher copolymerisierbarer Monomere und/oder b) Vinylacrylat- und/oder Vinylalkohol-Einheiten,
 - 1 bis 80 Gew.-%, bezogen auf das Polymere, an Einheiten eines vernetzenden Monomeren,
 - Einheiten von acetalgruppenhaltigen copolymerisierbaren Monomeren und
 - gegebenenfalls Einheiten weiterer copolymerisierbarer Monomere,

dadurch gekennzeichnet, daß sich die vernetzenden Einheiten B) von mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formeln



ableiten, wobei R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und Vinyl-, 1-Acyloxy-Vinyl, Allyl- oder 2-Acyloxy-Allyl bedeuten und die Acyloxy-Gruppen 2 bis 18 C-Atome enthalten, R^3 einen zweiwertigen, gesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 2 bis 8 C-Atomen darstellt, R^4 für einen zwei-, drei- oder vierwertigen, gesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 8 C-Atomen steht, m der Wertigkeit dieses Restes entspricht und X Acyloxy mit 2 bis 18 C-Atomen bedeutet, R^5 für $-(\text{CH}_2)_{1-20}$ -, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-19}$ - CH_2CH_2 - oder $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-19}$ - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ - und R^6 für Alkyl mit 1-4 C-Atome stehen, daß sich die Einheiten der Komponente C) von mindestens einer Verbindung der Formel V



herleiten, wobei R^7 und R^8 gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff oder unverzweigtes Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen stehen, R^6 die vorstehend genannte Bedeutung hat oder die beiden Reste R^6 zusammen auch R^3 , wie vorstehend definiert, sind und vorzugsweise einen Rest mit 2 bis 3 C-Atomen bedeuten;

daß die Komponente A) mindestens eine Verbindung aus der Gruppe Vinylether der Formel $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{OR}^9$, in der R^9 Methyl oder den Rest $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, darstellt, N-Vinylactam, N-Vinylalkylamid mit 1 bis 3 C-Atomen im Alkylrest oder Vinylacrylat mit 2 bis 18, vorzugsweise 2 bis 6 C-Atomen im Acrylatrest ist

und daß die Einsatzmengen der Monomerkomponenten folgende Werte haben:

A) 10 bis 90,

C) 0,5 bis 60, und

D) 0 bis 20 Gew.-%, wobei Summe der Komponenten A) bis D) stets 100% ist.

2. Verfahren zur Herstellung eines hydrophilen, vernetzten Polymerisats mit porösen, perlförmigen Teilchen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß A) a) wasserlösliche, copolymerisierbare Monomere und/oder b) Vinylacrylate, B) vernetzende Monomere, C) acetalgruppenhaltige copolymerisierbare Monomere und gegebenenfalls D) weitere copolymerisierbare Monomere in Gegenwart eines inerten Verdünnungsmittels, eines Dispersionsmittels und gegebenenfalls weiterer Zusatzstoffe sowie eines radikalisch wirksamen Initiators copolymerisiert und isoliert werden oder bei Vorliegen von Acylatgruppen im erhaltenen Copolymerisat diese vor der Isolierung zumindest teilweise in OH-Gruppen überführt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerisation als Suspensionspolymerisation, vorzugsweise in Gegenwart eines Dispersionsstabilisators, durchgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Dispersionsmittel eine neutrale oder alkalische wäßrige Pufferlösung verwendet wird.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Dispersionsmittel 0 bis 550 Gew.-% eines Elektrolyten enthält.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Dispersionsmittel eine nicht-ionogene, grenzflächenaktive Verbindung als Dispersionsstabilisator enthält.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerisation in Gegenwart von Di-n-butylether oder eines Gemisches aus Di-n-butylether und 2-Äthylhexanol durchgeführt wird.

8. Ausführungsform nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Vinylacrylat Vinylacetat darstellt.

9. Ausführungsform nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest

10 Gew.-% der Einheiten gemäß A) aus Vinylalkohol-Einheiten bestehen.

10. Ausführungsform nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Acyloxy-Gruppe in den Verbindungen der Komponente B) 2 bis 6 C-Atome besitzt.

11. Verwendung des vernetzten Polymerisats nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 8 bis 10, als Adsorbens in der Chromatographie.

12. Verwendung des vernetzten Polymerisats nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 8 bis 10 zur Herstellung trägegebundener, biologisch aktiver Substanzen.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65